

## 저수온 노출에 따른 돌돔(*Oplegnathus fasciantus*)과 민들조개(*Gomphina melanaegis*)의 생리활성 변화 연구

윤성진 · 진병선\* · 박경수†  
(한국해양과학기술원 · \*†안양대학교)

### Physiological Response of parrot fish (*Oplegnathus fasciantus*) and bivalve (*Gomphina melanaegis*) by Lowing Water Temperature Exposure

Sung Jin YOON · Byung Sun CHIN\* · Gyung Soo PARK†  
(Korea Institute of Ocean Science and Technology · \*†Anyang University)

#### Abstract

Physiological response of fish and bivalve was estimated to identify the physiological changes of test species by lowering water temperature due to the abrupt stop of cooling water discharge from power plant. The experiment was conducted by two conditions; fall and winter by decreasing water temperature (2°C/2 days) from 26°C to 17°C for fall scenario and from 15°C to 9°C for winter scenario, respectively. Test organisms were parrot fish (*Oplegnathus fasciantus*) and bivalve (*Gomphina melanaegis*), and end points were mortality for both species, hematocrit and cortisol for fish, and hemolymph and superoxide dismutase(SOD) for bivalve. 48/96hr mortality test revealed no mortality for fish and 47% mortality for bivalve at 96hr/26°C only. Significant increases of hematocrit and cortisol were found at fishes exposed to 26°C (high temperature) and lower temperature (9~13°C), respectively. Hemolymph and SOD for bivalve tended to decrease by lowering water temperature from 15 to 9°C (winter scenario) and no changes from 26 to 17°C (fall scenario). Fall scenario (from 15 to 9°C) showed more significant changes of physiological response than winter cases (26 to 17°C).

**Key words** : Physiological Response, Hematocrit, SOD, Hemolymph, Mortality, Cooling Water

#### I. 서론

해양생물의 스트레스에 관한 연구는 온도, 염분, 용존산소, 수용밀도 등의 물리적 스트레스와 일부 화학적 스트레스에 관한 연구가 이루어져 있으며, 이러한 스트레스는 질병에 대한 내성변화, 성장률, 먹이 섭취율 및 호흡 대사율 변화를 유발하는 것으로 보고되었다 (Kim and Kim,

2001; Kim et al., 2002; Steomarrsson and Imsland, 2003; Saucedo et al., 2004).

일반적으로 생물은 스트레스를 받게 되면 혈액상의 변화로 인해 스트레스의 강도에 비례적으로 코티졸이나 항산화효소 등의 활성이 변화되는 것으로 알려져 있다 (Davis et al., 1990; Parihar et al., 1996). 어류의 경우, 스트레스에 의한 생체 내 호르몬 분비는 대부분 시상하부-뇌하수체-부신피

† Corresponding author : 032-930-6032, gspark@anyang.ac.kr

\* 이 논문은 해양수산부 수산실용화기술개발사업 및 안양대학교 안식년 규정으로 수행/작성되었음.

질계의 조절기전에 의존하는데, 이 기전의 말초 호르몬인 코티졸 함량의 어체가 받는 스트레스 반응의 지표로서 널리 이용되고 있다 (Choi and Kim, 1990). 또한 적혈구는 생체의 산소운반 능력을 평가하는 척도로 사용되며, 스트레스를 받은 생물체는 혈액의 산성화 현상(acidosis)으로 인해 적혈구의 산소운반 능력이 떨어지는 것으로 보고되었다 (Perry and Reid, 1993).

패류는 스트레스에 의한 체내 반응으로써 superoxide, hydrogen peroxide 등의 활성산소가 발생하며, 활성산소는 세포나 기관의 막을 공격하여 세포의 기능을 손상시킨다 (Ferraris et al., 2002). 이러한 활성산소에 대하여 체내에서는 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD)와 catalase (CAT) 등을 생성하여 세포기능 손상을 막는 것으로 알려져 있다 (Chance et al., 1979). 한편 항산화효소는 온도변화나 중금속 등의 이온 노출에 의해서도 효소 활성의 변화가 관찰되어 생체내의 스트레스 반응과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었다 (Chen and Chen, 2000). 패류의 혈구세포(hemocytetes)는 항산화효소와 더불어 생물의 스트레스와 대사 작용의 변화를 관찰하는 지표로서 사용되며, 상처의 수복, 패각의 재생, 영양물질의 소화와 수송, 배설 및 생체방어에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Cho et al., 2002).

발전소 배출구 주변의 해양생물 연구는 주로 온배수를 대상으로 하여 수온 상승에 따른 생태계 영향 평가(heat shock)에 초점을 두고 수행되었다 (Shim et al., 1991; Chant et al., 2002). 그러나 최근 들어 급격한 전력사용, 환경규제 및 생태계 보전과 관련된 요구사항의 강화로 인해 발전소의 가동은 자연적 또는 인위적인 요인에 의한 일시적인 가동 중단이 예상되며, 이로 인한 온배수 방출 중단 상황이 발생하여 주변 해수보다 상대적으로 낮은 저수온의 배출수에 의해 주변 해양생태계의 변화를 초래할 수 있을 것으로 예상된다. 특히 발전소의 온배수 가동 중단에 따른 저수온 배출수의 방출은 기존에 온배수에 적

응되어 있던 주변 해양생태계에 영향을 줄 수 있음에도 불구하고 현재까지 저수온 노출에 따른 해양생물의 사망 및 생리 스트레스 반응을 규명하기 위한 연구는 거의 수행되지 않았다. 이에 본 연구는 시나리오별로 수온을 하강시키면서 급작스런 저수온 환경에 노출된 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*)과 민들조개(*Gomphina melanaegis*)의 사망 및 생물 체내의 생리활성 변화를 관찰하였으며, 이를 활용하여 cold shock에 의한 해양생물의 생리 스트레스 반응 차이를 규명하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험생물의 획득 및 유지

돌돔(TL 122.3±2.6mm, 45.2±5.6g)과 민들조개(SL 35.7±1.3mm, 11.5±1.2g)는 울릉도를 포함한 동해안 연안에서 어획된 개체들을 직접 구입하여 실험실로 운반하였으며, 두 종 모두 20일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 시나리오별로 저수온에 노출시켰다. 돌돔은 500 L 수조에서 수온 16.0±1.0°C, 염분 33.0±1.0 psu, pH 7.8±0.5, 용존산소(dissolved oxygen, DO) 7.0±1.0 mg/L 범위에서 실험 전까지 유지하였다. 먹이는 넙치 치어용 상업용 사료를 1일 2회 공급하였다. 민들조개는 60 L 수조에서 16.1±0.5°C 수온, 32.5±1.0 psu 염분, pH 7.7±0.4, 용존산소 7.3±1.2 mg/L 범위에서 실험 전까지 유지하였다. 먹이는 식물플랑크톤 4종(*Skeletonema costatum*, *Tetraselmis suecica*, *Chlorella vulgaris*, *Isochrysis galbana*)을 동일한 부피 비율로 혼합하여 2일마다 500 mL 씩 공급하였다.

### 2. 수온변화에 따른 생존을 실험

돌돔과 민들조개의 생존을 실험과 관련된 실험 조건은 <Table 1>에 자세히 수록하였다. 실험은 두 종 모두 16°C에서 2주 이상 적응시킨 후(대조

<Table 1> Test parameters of water temperature stress test for fish and bivalve

	Test organisms	
	Fish (parrot fish)	Benthos (Bivalve)
Test Type	Flow through	Flow through
End Point	Mortality	Mortality
Test Organisms	Parrot fish ( <i>Oplegnathus fasciantus</i> )	Bivalve ( <i>Gomphina melanaegis</i> )
Test Organism Size (mm)	107.4±4.4 (TL)	37.8±2.0 (TL)
Water Temperature Range	16~26℃	16~26℃
Salinity (psu)	33.0~34.1	33.3~4.5
pH	7.8~8.1	7.8~8.0
DO (mg/L)	6.5~7.3	6.8~7.5
Light Intensity	Laboratory	Laboratory
Light Periods(L : D)	12h : 12h	12h : 12h
Test Volume (L)	400	60
Water Volume (L)	300	40
Number of Organisms	10	10
Feeding	No	No
Replicates	3	3
Test Acceptability Criteria	>90% Survival in Control	>90% Survival in Control

구) 2일과 4일에 2℃씩 (2℃/2d, 2℃/4d) 단계적으로 수온을 상승시키면서 실험생물의 생존 여부를 관찰하였다. 실험기간 중 생물은 먹이 급이에 따른 대사활동 변화를 최소화시키기 위해 실험 48시간 전부터 절식시켰으며, 실험 중에는 먹이를 공급하지 않았다.

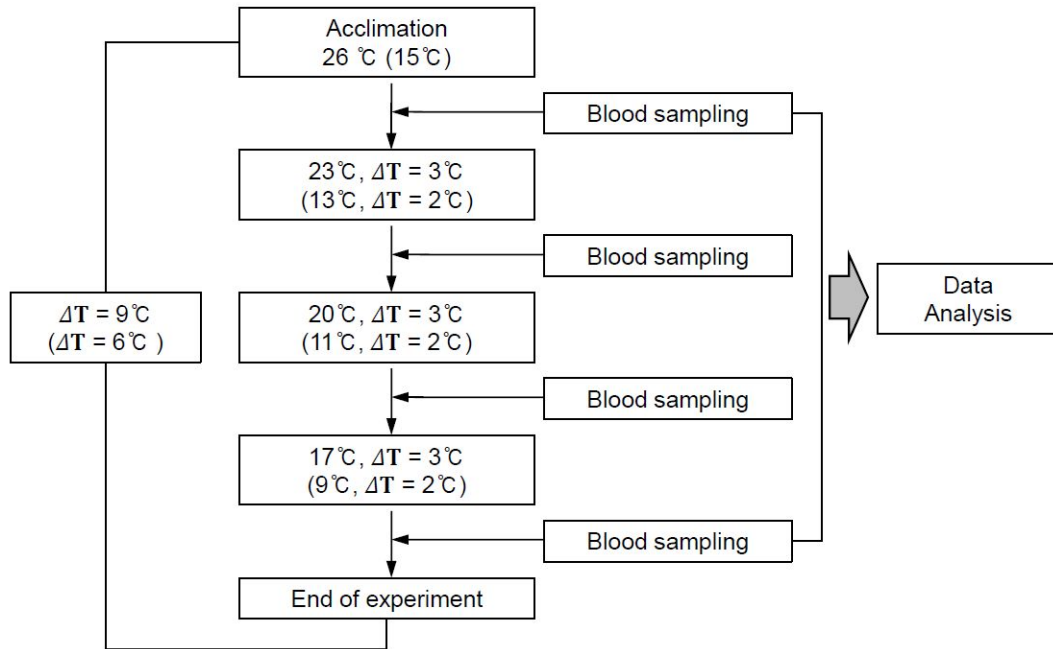
### 3. 저수온 노출에 따른 생리활성 영향 실험

본 연구는 온배수 방출 중단 시 주변 해수와의 최대 수온차(ΔT=3℃)를 예상하여 추계와 동계로 구분하여 수온하강에 따른 돌돔과 민들조개의 저수온 노출 실험을 실시하였다(Fig. 1). 수온하강에 따른 실험생물의 저온 충격 평가 실험은 각각의 측정항목에 따라 예비실험을 거쳐 본 실험을 실시하였다. 수온 저하 경과시간은 최대 2일로 설정하였으며, 수온하강 폭은 해수의 온도를 감안하여 추계(ΔT=3℃)와 동계(ΔT=2℃) 시기를 각각 구분하였다. 추계 저수온 노출 실험은 17~26℃ 수온 범위에서 수행하였으며, 실험구간은 실험최대 수온(26℃)으로부터 2일 마다 3℃씩

수온을 하강시켰다(ΔT=3℃). 동계 수온을 기준으로 한 생리활성 실험은 15~9℃ 수온 범위에서 수행하였으며, 실험구간은 실험최대 수온(15℃)으로부터 2일 마다 2℃씩 수온을 하강시켰다(ΔT=2℃). 생리활성 물질은 두 생물을 대상으로 저수온 노출실험이 종료되는 시점에 돌돔과 민들조개 4개체에 대한 시료를 채취하여 분석 시료로 사용하였다. 분석항목은 돌돔의 경우 혈액의 적혈구 용적과 코티졸 농도를 분석하였으며, 민들조개는 혈구수와 항산화효소 중 SOD 농도를 측정하였다.

### 4. 생리활성물질 분석

어류의 혈액은 페녹시에탄올(phenoxy ethanol)을 해수와 1% (V/V) 이내로 혼합한 용액에 어류를 마취시킨 후 아가미 부분의 동맥에서 헤파린을 처리한 주사기를 사용하여 1분 이내에 개체별로 채취하였다. 채취한 혈액은 즉시 헤파린 처리가 된 튜브에 분주한 후, 원심분리기에서 혈장을 분리하였으며, 추출한 혈장은 -70℃에서 동결보관



[Fig. 1] Water temperature changes and blood sampling with fall and winter (parenthesis) test scenario

한 후 코티졸 농도분석에 사용하였다. 코티졸 농도분석은 cortisol EIA kit(Enzo, 미국)를 사용하여 항원-항체반응을 유도한 다음 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 제조사에서 제공하는 매뉴얼에 따라 코티졸 농도로 환산하였다. 적혈구 용적은 혈액을 채취한 후 4,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후 적혈구와 혈장부분의 길이에 대한 적혈구 부분의 비율을 산출하였다. 민들조개의 혈액 샘플은 심장 옆 혈관에서 1 mL 주사기(바늘규격 26GX 1/2)를 이용하여 500  $\mu$ l를 채취한 뒤, 이 중 200  $\mu$ l를 취하여 혈구계산판을 이용하여 광학현미경 하에서 혈구수를 계수하였다. SOD는 민들조개의 아가미 부위를 적출하여 전처리 과정을 거친 후 분석하였다. 시료는 아가미 부위를 적출한 후 약 0.1g을 NaCl에 3회 세척한 후 KCl (1.17%)을 함유한 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 균질화하였다. 균질화된 시료는 원심분리(1,000 rpm, 15 min, 4°C)에 의해 지방 및 침전물을 제거하였다. 균질액은 다시

원심분리(13,000 rpm, 20 min, 4°C)한 후 상등액을 항산화효소 측정용 시료로 사용하였다. SOD는 pyrogallol의 자동 산화율을 억제하는 양을 측정하는 방법으로써 Marklund and Marklund (1974)에 의해 실시한 방법을 적용하였다.

실험은 50mM phosphate buffer (pH 8.24) 1.3 mL에 아가미 균질액 25  $\mu$ l를 넣은 후 3 mM pyrogallol 용액 45  $\mu$ l를 첨가하여 37°C 배양기에서 20분간 배양하였다. 배양된 시료는 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 325 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. SOD 효소활동의 1단위는 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하여 표시하였다.

## 5. 통계분석

본 연구에서는 추계와 동계 시나리오를 적용하여 수행한 돌돔 및 민들조개의 수온별 생리 활성 물질 농도를 이용하여 일원분산분석(one factor

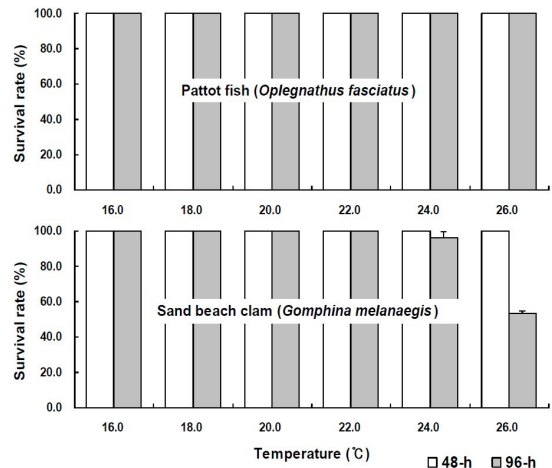
ANOVA)을 실시하여, 각각의 실험 수온별 대상 생물의 생리 반응에 대한 유의성을  $\alpha=0.05$  유의 수준에서 검증하였다. 본 분석의 처리 효과(treatment effect)는 수온이며, 종속변수는 돌돔의 경우 적혈구 용적률 및 코티졸 농도이며, 민들조개는 혈구수 및 SOD 농도이다. 분산분석은 자료의 정규분포(normal distribution)과 등분산성(equal variance)을 가정하므로 각각의 조건이 만족하는지 여부를 카이제곱검정과 F 검정으로 검증하였다. 두 검정 모두 유의수준  $\alpha=0.05$ 에서 돌돔의 적혈구 용적률과 코티졸 농도, 민들조개의 혈구수 및 SOD 농도는 정규분포를 따랐으며, 등분산성의 경우 동계 수온변화 시나리오를 가정한 돌돔의 적혈구 용적률만 이분산성으로 나타났고( $p=0.02$ ), 나머지 항목에서는 모두 등분산을 보였다.

### III. 결 과

#### 1. 수온에 따른 시험생물의 생존율

본 실험은 온배수의 온도가 가장 높을 때의 실험 최대 수온을 26℃로 설정하여 실험생물의 적응 가능성 및 수온변화에 따른 실험생물의 생존율 차이를 관찰하였다. 16~26℃ 수온구간에서 수온상승에 따른 돌돔과 민들조개의 생존율 변화를 관찰한 결과, 돌돔은 16℃ 수온에서 48시간과 96시간 마다 2℃씩 수온을 상승시키면서 생존율 변화를 관찰한 결과 모든 수온구간에서 사망한 개체가 발생하지 않았다([Fig. 2]). 그러나 노출 시간이 경과함에 따라 실험용수의 탁도 및 암모니아성 질소 농도는 수온 상승과 더불어 증가하는 경향을 보였는데, 이는 고수온에서 실험생물을 장기간 동안 유지하기 위해서는 해수의 교환 및 수질관리에 주의를 기울여야 할 것으로 판단되었다. 수온상승에 따른 민들조개의 생존율 변화는 돌돔과 같은 방법으로 16℃ 수온에서 2일, 4일 마다 2℃씩 수온을 상승시키면서 관찰하였다. 민

들조개는 16~22℃수온구간에서는 실험기간(48, 96h)에 상관없이 사망한 개체가 발생하지 않았으며, 특히 48시간 간격으로 수온을 상승시킨 경우에는 26℃ 수온에서도 100% 생존하는 것으로 나타났다. 그러나 96시간 간격으로 수온을 상승시킨 결과, 민들조개는 24℃ 수온에서 95% 가량이 생존하였으나 26℃ 수온에서는 53.3%의 생존율을 보였다([Fig. 2]).

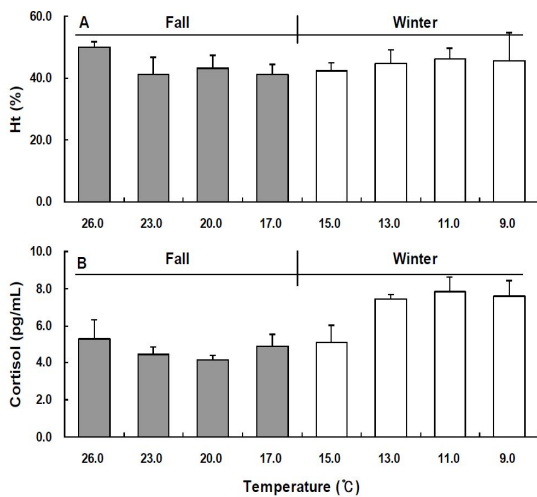


[Fig. 2] Mortality of parrot fish and sand beach clam by decreasing water temperature

#### 2. 수온에 따른 돌돔의 생리활성물질 변화

추계 온배수 방출 증지에 따른 수온하강에 따른 돌돔의 적혈구 용적(%) 변화는 실험어류를 26℃ 사육 수온에서 20일 동안 순치시킨 후 17℃ 수온까지 2일 간격으로 3℃씩 수온을 하강시키면서 어류의 혈액을 채취하여 분석하였다. 분석결과 돌돔의 적혈구 용적은 41.1~49.9% 범위로 사육수온(26℃)에서 가장 높았으며, 수온이 감소된 23℃와 17℃에서 비교적 낮게 분석되었으며, 수온이 하강함에 따라 적혈구 용적이 다소 감소하는 경향을 보였다. 한편 적혈구 용적은 23℃와 17℃에서의 각각  $41.1 \pm 5.7\%$ 와  $41.1 \pm 3.3\%$ 로 큰 차이를 보이지 않았다. 동계 시나리오를 적용하여 실험한 돌돔의 적혈구 용적은 15℃ 수온구간에서

42.4±2.7%이었으며, 노출 경과시간이 2일 지난 후 13℃ 수온에서 적혈구 용적은 44.8±4.2%로 다소 감소하였다. 그러나 11℃로 수온을 하강시킨 후 분석한 적혈구 용적은 46.3±3.3%로 다시 증가하였으며, 이후 9℃ 수온에서는 45.7±7.2%로 감소하였다. 본 실험에서 동계 돌돔의 혈액 내 적혈구 용적은 11℃와 9℃에서 다소 높았으며, 15℃ 수온에서는 낮게 분석되었다([Fig. 3A]).



[Fig. 3] Changes of fish hematocrit (A) and cortisol (B) by decreasing water temperature

추계 수온하강 시나리오를 적용한 돌돔의 코티졸 농도 변화를 관찰한 결과, 26℃에서의 코티졸 농도는 5.27±1.06 ng/mL이었으며, 23℃와 20℃ 수온에서는 각각 4.44±0.40과 4.17±0.23 ng/L로 두 수온구간에서의 코티졸 농도는 큰 차이를 보이지 않았다. 한편 수온을 17℃로 하강시켜 분석한 코티졸 농도는 4.86±0.64 ng/mL로 증가하는 양상을 보였다. 본 실험기간 동안 돌돔의 혈액에서 채취한 코티졸 농도는 26℃에서 가장 높게 나타났으며, 20℃까지 수온이 하강하는 동안 감소한 후 17℃에서는 다시 증가하는 것으로 분석되었다. 동계 각각의 수온에서 분석한 돌돔의 코티졸 농도는 적혈구 용적의 변화와 다소 차이를 보였는

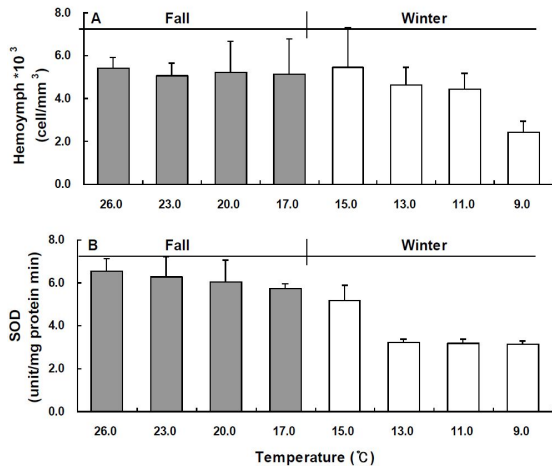
데, 돌돔의 경우 15℃ 수온에서 5.08±0.77 ng/mL로 가장 낮은 농도 값이 분석되었으며, 13~9℃ 수온구간에서는 평균 7.40 ng/mL보다 높은 농도를 유지하였다. 본 실험에서 동계 일시적인 발전소 가동 중지 시 수온 하강에 따른 돌돔의 코티졸 농도는 수온이 11℃까지 하강함에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 9℃ 수온에서는 11℃에서의 농도보다 다소 감소하였으나, 15℃에서 분석한 결과와는 큰 차이를 보였다([Fig. 3B]).

### 3. 수온에 따른 민들조개의 생리활성물질 변화

이매패류인 민들조개의 혈구수는 26℃ 수온에서 평균 5.41×10<sup>3</sup> cell/mm<sup>3</sup>으로 분석되었으며, 이후 수온을 하강시킴에 따라 23, 20, 17℃에서 각각 5.06×10<sup>3</sup>, 5.20×10<sup>3</sup> 및 5.15×10<sup>3</sup> cell/mm<sup>3</sup>로 26℃에 비해 다소 낮은 값을 보였다. 추계 수온하강 시나리오를 적용한 저서생물의 혈구수는 순치수온인 26℃를 제외하고는 대부분 낮게 조사되었으며, 수온 구간별로 큰 차이를 보이지 않았다. 실험기간 동안 민들조개의 혈구수는 20℃ 수온까지는 다소 증가하였으나 17℃로 수온이 하강하면서 감소하는 경향을 보였다. 동계 시나리오의 경우, 민들조개의 혈구수는 15℃ 수온에서 가장 높은 5.47×10<sup>3</sup> cell/mm<sup>3</sup>이 계수되었으며, 이후 수온이 하강함에 따라 13℃에서는 4.62×10<sup>3</sup>, 11℃에서는 4.43×10<sup>3</sup>, 9℃에서는 2.42×10<sup>3</sup> cell/mm<sup>3</sup>의 혈구수가 관찰되었다. 동계 저서생물의 혈구수는 15℃를 수온에서 2℃씩 수온을 하강시킴에 따라 수온 하강과 더불어 점차적으로 감소하는 경향을 보였다([Fig. 4A]).

본 연구기간 동안 민들조개의 SOD 분비 농도는 수온이 하강함에 따라 점차적으로 감소하는 경향을 보였다. 추계 수온 하강 시나리오를 적용하여 분석한 결과 SOD 농도는 26℃에서 6.54±0.61 unit/mg protein min이었으며, 23℃로 수온을 하강시킨 경우 6.26±0.95 unit/mg protein min

로 감소하였다. 또한 수온을 48시간 마다 20℃와 17℃로 하강시킨 후 분석한 결과 SOD 농도는 각각  $6.04 \pm 1.01$ 과  $5.73 \pm 0.25$  unit/mg protein min로 노출 수온이 낮을수록 SOD의 분비량이 감소하였다. 동계 저수온 노출 시나리오에서 최대 수온을 15℃로 설정한 후 순치기간을 거쳐 저서생물의 SOD 농도를 분석한 결과, 민들조개는  $5.19 \pm 0.69$  unit/mg protein min의 효소를 분비하였으며, 13℃로 수온을 하강시킨 후 2일 동안 노출된 민들조개의 SOD 농도  $3.23 \pm 0.13$  unit/mg protein min로 급격하게 감소하였다. 또한 11℃와 9℃로 수온을 하강시켜 48시간 저수온에 노출된 민들조개의 SOD 농도는 각각  $3.18 \pm 0.21$ 과  $3.15 \pm 0.14$  unit/mg protein min로 감소하였으며, 농도의 감소폭은 13℃에서 분석한 결과와 큰 차이를 보이지 않았다 ([Fig. 4B]).



[Fig. 4] Changes of bivalve hemolymph (A) and SOD (B) by decreasing water temperature

#### IV. 고찰

본 연구에서 48시간과 96시간 간격으로 수온을 상승시켜 생물의 생존율을 관찰한 결과, 돌돔은 모든 수온구간에서 100% 생존하였으며, 민들조개는 96시간 간격으로 실험수온에 노출시킨 경우

24℃에서 95% 가량이 생존하였으나 26℃에서는 53.3%의 생존율을 보였다. 그러나 본 연구에서는 해수만을 이용하여 실험을 수행하였기 때문에 실제 자연 생태계에서는 퇴적물 속에 잠입함으로써 생존력을 높일 수 있을 것으로 판단된다.

수온하강에 따른 어류의 적혈구 용적률은 추계의 경우, 26℃에서 가장 높았으며, 23℃와 17℃에서 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 동계 돌돔의 혈액 내 적혈구 용적은 11℃와 9℃에서 다소 높았으며, 15℃ 수온에서는 낮게 분석되었다. 일반적으로 생체의 산소운반능력을 나타내는 적혈구 용적률은 수온 상승 자극 시 증가하였으며, 하강 시 감소하는 경향을 보였다. 예를 들면 참돔과 양식넙치(*Paralichthys olivaceous*)를 대상으로 연속적인 수온 급강하의 생리적 영향을 분석한 결과 혈액 내 적혈구 용적은 수온 하강 시 감소하고 수온 상승 시 증가하는 경향을 보여 수온 급변에 대한 스트레스 반응을 나타내었다(Ishioka, 1980; Chang et al., 1999). Yang and Yeo (2001)의 생리 연구에 의하면, 넙치의 적혈구 용적은 수온 상승과 더불어 증가하였다. 본 연구에서 분석된 돌돔의 적혈구 용적률은 수온 구간별로 다소 차이를 보였는데, 추계 26~17℃ 수온구간에서는 수온이 하강함에 따라 26℃ 수온에서 통계적으로 높은 용적률을 보였으나( $p < 0.05$ ) 타 수온구간에서는 통계적 차이가 없었다(<Table 2>). 그러나 동계(15~9℃)에는 미세하게 증가하는 경향을 보여 수온 하강에 따른 적혈구 용적률 변화가 Ishioka (1980)와 Chang et al. (1999)의 결과와 차이를 보였다. 이와 같은 본 연구에서 나타난 수온 하강에 따른 적혈구 용적의 변화는 시험생물의 주요 서식 환경 및 서식 수온과 관련이 있는 것으로 판단된다. 또한 26℃ 결과를 제외한 추계 및 동계 분석 값은 큰 차이를 보이지 않아 생물의 주요 서식 수온 범위를 초과하지 않는 조건에서는 수온이 하강함에 따라 생물이 받는 스트레스가 적은 것으로 판단된다.

<Table 2> ANOVA tables for physiological response of fish by decreasing water temperature

Fish hematocrit (Fall scenario)						
Parameters	SS	DF	MS	F ratio	P-value	F critical
Treatment	1.062	3	0.354	4.62	<b>0.028</b>	3.71
Residual	0.766	10	0.077			
Total	1.828	13				
Fish hematocrit (Winter scenario)						
Parameters	SS	DF	MS	F ratio	P-value	F critical
Treatment	0.197	3	0.066	0.54	0.663	3.49
Residual	1.455	12	0.121			
Total	1.651	15				
Fish cortisol (Fall scenario)						
Parameters	SS	DF	MS	F ratio	P-value	F critical
Treatment	0.022	3	0.007	2.13	0.1494	3.49
Residual	0.040	12	0.003			
Total	0.062	15				
Fish cortisol (Winter scenario)						
Parameters	SS	DF	MS	F ratio	P-value	F critical
Treatment	0.097	3	0.032	18.00	<b>0.0001</b>	3.49
Residual	0.022	12	0.002			
Total	0.118	15				

한편 수온 스트레스는 수온상승과 함께 비례적으로 코티졸의 활성이 높아지는 것으로 알려져 있다 (Davis et al., 1990; Parihar et al., 1996). 본 연구에서 코티졸 농도는 적혈구 용적의 분포와 유사하게 추계에 26℃에서 다소 높게 나타났으나 23℃와 20℃에서는 뚜렷한 차이를 보이지 않아 수온하강에 따른 체내 생리대사 활동에 영향을 받지 않는 것으로 분석되었다(p>0.05). 그러나 동계 수온 하강 시나리오에 적용하여 분석한 돌돔의 코티졸 농도는 13℃ 이하의 저수온 환경에서 증가하여 수온 하강에 따른 생리 활성의 영향이 발생할 수 있는 것으로 분석되었다 Yang and Yeo (2001)는 혈장의 코티졸 농도는 대조구(20℃)와 비교하여 15℃에서 감소하였고, 10℃와 30℃에서는 농도 상승 후 일정기간이 경과함에 따라 회복되었으나 25℃에서는 장시간 코티졸 농도가 유지되는 것으로 보고하였다. 또한 Kang et al. (2007)은 양식산 가승어 *Mugil haematocheilus*를 대상으로 동계 한파 모델에 대한 단기간 저수온

충격이 생체에 미치는 영향을 실험한 결과, 10℃에서 2.5℃로 수온을 급강하시켰을 때 수온 하강에 따른 스트레스 관련 생체지수의 변화와 코티졸 및 갑상선과 같은 내분비 물질의 급격한 증가 현상을 보고하였다(<Table 2>). Chang et al. (1999)의 실험에서도 양식 넙치의 코티졸 농도는 수온의 급감함에 따라 유의하게 증가하였다. 특히, 코티졸은 수온 변화 폭이 크고, 수온이 낮을수록 농도 변화가 큰 것으로 나타나 반복적인 수온 변화에 넙치가 스트레스를 받은 것으로 판단하였다.

본 연구에서 돌돔은 통계적으로 추계 시나리오에서는 수온 하강에 따른 생리적 영향의 유의성이 없었으나 동계 시나리오를 적용할 경우 13℃ 이하의 저수온 환경에서는 대사 활동에 다소 영향을 미치는 것으로 분석되었다. 이와 같은 결과는 어류의 수온 상승에 따른 생리 반응이나 연속적인 급강하에 따른 결과와 비교하여 스트레스 반응의 강도를 판단하기에는 무리가 있다. 그러



나 동계 실험에서 나타난 결과는 추계와 다른 양상을 보였는데, 15~9°C 수온 구간에서 수온이 하강함에 따라 코티졸의 농도가 증가하여 저수온 환경에서는 돌돔이 다소 생리적인 영향을 받는 것으로 판단된다.

수온 변화에 따른 어류의 스트레스 강도에 의한 코티졸 농도 변화는 수온의 변화 폭에 따라 차이를 보이는 것으로 보고되고 있다. 예를 들면, Hur (2002)는 넙치가 스트레스를 받지 않은 안정 상태에서 코티졸 농도는 0.3~22.7 ng/mL (평균 3.9 ng/mL)로 보고하였으며, 연어과 어류에서는 안정 상태이거나 스트레스를 받지 않은 상태에서의 혈중 코티졸 수준은 30~40 ng/mL이고, 이상적인 상태에서는 5 ng/mL 이하로 보고하였다 (Pickering et al., 1989). 한편 An et al. (2010)은 감성돔을 대상으로 수온 및 염분 변화에 따른 스트레스 반응을 관찰한 결과, 24시간 간격으로 수온을 20°C(대조구)에서 30°C로 상승시킨 경우 코티졸 농도는 5.3±1.3 ng/mL에서 45.0±1.3 ng/mL로 증가하여 수온상승에 따른 어류의 스트레스 반응을 보고하였다(<Table 3>).

이와 같이 코티졸 농도는 생물종, 크기 및 스

트레스의 강도에 따라 차이를 보이는데, 수온 스트레스에 의한 생물의 혈액에서 분비되는 코티졸 농도는 안정된 상태보다 외부의 스트레스에 노출된 후 큰 폭으로 높아지는 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서 수온 구간별 코티졸 농도는 스트레스 반응으로 인해 나타나는 농도의 변화와 비교하여 농도의 변화폭이 크지 않은 것으로 분석되었다. 본 연구에서 수행한 수온 변화 시나리오별 수온 하강에 따른 생물의 스트레스 반응의 경우, 13°C 이하의 저수온 환경에서 시험 생물은 단기간의 수온 하강에 따른 생리적 영향이 나타났으나, 다른 연구 결과와 비교해 볼 때 추계와 동계 수온 변화 시나리오를 적용한 경우 2~3°C/48h의 단계적인 수온 하강은 어류의 생존, 성장 및 대사활동과 같은 생리적 특성 변화에 심각한 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

해양생물의 스트레스는 염분변화에 의해서도 발생할 수 있는데, Hur et al. (2003)은 15 psu의 저염분에 노출된 넙치의 경우, 30일 동안 사육한 결과 대조구(35 psu) 보다 생존율이나 성장률이 다소 낮았으나 코티졸, 글루코오즈, Na, Cl 및 삼투질 농도 등은 대조구와 실험수 사이에 차이를

<Table 3> Changes of cortisol concentration (ng/mL) before and after of water temperature and salinity stress

	Changes of Cortisol		Exposure time (h)	References	
	Before	After			
Flounder ( <i>Paralichthys olivaceus</i> )	18→9°C	3.6±1.3	17.4±5.5	9	Chang et al. (1999)
	20→17°C	1.5±0.1	4.6±0.1	120	
	23→14°C	2.0±0.8	7.3±0.7	360	
Flounder ( <i>Paralichthys olivaceus</i> )	20→10°C	4.9±2.5	12.1±0.7	1	Yang and Yeo (2001)
	20→30°C	4.9±2.5	13.0±4.3	1	
Mullet ( <i>Mugil haematocheilus</i> )	10→2.5°C	48.5±4.8	173.7±20.1	48	Kang et al. (2007)
Black porgy ( <i>Acanthopagrus schlegeli</i> )	20→30°C	5.3±1.3	45.0±1.3	10	An et al. (2010)
Flounder ( <i>Paralichthys olivaceus</i> )	20→15psu	3.0±1.9	2.3±1.1	360	Hur et al. (2003)
Perch fry ( <i>Lateolabrax japonicus</i> )	30→2psu	50±3	161±35	1	Han et al. (2003)
			185±30	24	

보이지 않는 것으로 보고하였다. An et al. (2010)은 코티졸 농도를 분석하여 감성돔의 저염분 스트레스의 반응을 관찰하였는데, 35 psu(대조구), 10 psu 및 0 psu에서의 코티졸 농도는 각각  $5.3 \pm 1.3$ ,  $15.1 \pm 4.7$  및  $30.5 \pm 7.5$  ng/mL로 분석되어 염분이 감소함에 따라 감성돔의 스트레스가 증가함을 보고하였다. Han et al. (2003)은 농어 *Lateolabrax japonicus* 유어의 염분 변화에 따른 생리 반응을 관찰한 결과, 30 psu에서 2 psu로 1시간 동안 노출된 농어의 코티졸 농도는  $50 \pm 30$  ng/mL에서  $161 \pm 35$  ng/mL로 증가하였으며, 24시간 후에는  $185 \pm 30$  ng/mL로 분석되어 저염분 노출에 따라 코티졸 농도가 증가하는 것으로 보고하였다(<Table 3>).

이와 같이 염분 스트레스에 의한 생물의 혈액 성분 내 코티졸 분비는 안정된 상태보다 저염분에 노출된 후 큰 폭으로 증가하는 것으로 판단된다. 한편 Barton et al. (1980)은 무지개 송어의 경우 스트레스에 따른 코티졸 농도의 회복시간을 1~3시간째까지 증가하다가 6시간 이내에 안정된 값으로 회복되며, Bratton and Iwama (1991)는 코티졸 농도의 회복시간은 어종, 스트레스의 종류 및 강도에 따라 다르게 나타나는 것으로 보고하였다. 돌돔은 수온 20°C 이상을 선호하고 25°C 내외가 적정 수온으로 보고되었다 (Kim et al., 2008). 이와 같은 결과로 비루어볼 때 추계 수온 하강 시나리오를 적용할 경우, 돌돔은 대사활동에 영향을 받지 않을 것으로 판단된다. 그러나 동계 13°C 이하의 저수온 환경에서는 적계나마 수온 변화에 따른 스트레스 영향을 받을 것으로 해석할 수 있다. 따라서 동계 수온의 급작스런 변화는 가두리 양식 어류나 비유영성 또는 저유영성 생물에게는 수온 하강에 따른 스트레스 영향을 받을 수 있으나, 상대적으로 유영성이 강한 어류의 경우는 호조건의 서식 수온을 찾아 이동할 수 있기 때문에 그에 따른 피해를 입지 않을 것으로 판단된다.

본 연구에서 민들조개의 혈구수는 26°C에서 가

장 높았으나 이후 17°C까지 수온을 하강시킴에 따라 뚜렷한 차이를 보이지 않아 스트레스 반응이 나타나지 않았다. 동계 민들조개의 혈구수는 15°C 수온에서 가장 높았으며, 이후 2°C씩 수온을 하강시킴에 따라 수온 하강과 더불어 점차적으로 감소하는 경향을 보였다. 수온변화에 따른 패류의 혈구수 변화는 생물종에 따라 다소 차이를 보인다. 시볼트 전복 *Haliotis sieboldii* 치패의 급격한 수온 변화 스트레스는 대조구(20°C) 보다 초기에 많은 스트레스 요인으로 작용하였는데, 저수온 스트레스인 경우 혈림프 생성을 저해하는 생리 현상이 나타나고, 고수온 스트레스일 경우 혈림프가 증가하는 것으로 보고되었다 (Kim et al., 2006). 본 연구에서는 추계 시나리오를 적용할 경우 26°C에서 혈구수가 높았으나, 23~17°C 수온 구간에서는 뚜렷한 증감현상이 나타나지 않았다. 그러나 동계 실험 결과에서는 수온이 하강함에 따라 혈구수가 유의하게 감소하는 것으로 나타났는데, 이는 저수온 상태에서의 혈림프 생성 저해현상을 보고한 Kim et al. (2006)의 결과와 유사한 생리활성 과정에서 기인된 결과로 판단된다(<Table 4>). 한편 Kim et al. (2005)은 전복 *H. discus hannai* 치패의 혈림프를 수거하여 급격한 수온 스트레스에 따른 글루코오스 및 혈당 변화를 관찰하였으나, 개체간의 차이가 크거나 스트레스에 대한 일관성 있는 결과를 도출하지 못했다.

민들조개의 아가미를 적출하여 분석한 SOD 농도는 노출수온이 낮을수록 분비량이 감소하여 추계의 경우, 26°C에서 가장 높은 반면 17°C에서 낮게 분석되었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 그러나 동계 수온 구간별 민들조개의 SOD 농도는 15°C에서 가장 높았으며( $p < 0.05$ ), 그 외 수온구간에서는 통계적으로 뚜렷한 차이를 보이지 않았다(<Table 4>). Kim et al. (2005)은 참전복에 급격한 스트레스를 가한 경우, 고수온에 노출된 개체는 항산화효소의 분비가 급격히 상승하였으며, 저수온에서 수온 스트레스 자극 직후에 증

<Table 4> ANOVA tables for physiological response of bivalve by decreasing water temperature

Bivalve SOD (Fall scenario)						
Parameters	SS	DF	MS	F ratio	P-value	F critical
Treatment	1.410	3	0.470	0.79	0.520	3.49
Residual	7.095	12	0.591			
Total	8.505	15				

Bivalve SOD (Winter Scenario)						
Parameters	SS	DF	MS	F ratio	P-value	F critical
Treatment	12.019	3	4.006	29.10	<b>0.00001</b>	3.49
Residual	1.652	12	0.138			
Total	13.671	15				

Bivalve hemolymph (Fall scenario)						
Parameters	SS	DF	MS	F ratio	P-value	F critical
Treatment	0.003	3	0.001	0.11	0.954	3.49
Residual	0.123	12	0.010			
Total	0.127	15				

Bivalve hemolymph (Winter Scenario)						
Parameters	SS	DF	MS	F ratio	P-value	F critical
Treatment	0.283	3	0.094	9.21	<b>0.002</b>	3.49
Residual	0.123	12	0.010			
Total	0.406	15				

가한 후 감소하는 것으로 보고하였다. 그러나 Kim et al (2006)의 시볼트 전복에 대한 수온 스트레스 실험에서는 항산화효소 농도가 모든 실험구에서 실험 개시 직후에는 대조구(20℃) 보다 낮았으며, 10℃와 15℃에서 4시간 경과한 후 가장 높은 활성을 보이는 것으로 보고하였다. 본 연구에서 SOD 농도는 추계 26℃에서 높았으며, 수온이 하강함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 또한 동계 실험에서는 15℃와 타 실험구(13~9℃) 사이의 농도 차이가 뚜렷하였다. 이와 같은 결과는 Kim et al. (2005)의 결과와 유사하지만, Kim et al. (2006)과는 상이한 결과를 보였다. 이는 실험생물의 생리-생태적 특성 및 서식환경 조건에 따라 생물의 수온 스트레스에 반응하는 정도의 차이가 상이한 것으로 해석할 수 있다. 수온변동에 따른 민들조개의 생리활성 변화는 현재 까지 보고된 바 없다. 또한 민들조개는 10~22℃ 수온 범위의 낮은 수심에서 서식하는 것으로 알려져 있는데(Lee, 2009), 포복성인 전복류와는

달리 모래나 펄의 기질 속에 잠입하여 생활하기 때문에 비교적 수온 변화가 적은 환경에 서식하는 것으로 생각된다. 따라서 민들조개는 본 연구에서 설정한 추계와 동계의 수온 변화 구간에서는 시볼트 전복의 반응과 유사하게, 일정기간 동안 단계적으로 수온을 하강시킬 경우 서서히 저수온 환경에 적응하며, 체내 항산화효소의 분비량도 저수온 환경에 동기화되어 감소시킴으로써 체내 에너지 소비를 최소화 하는 방향으로 대사를 진행할 것으로 판단된다.

## References

- An, Kwang-Wook · Shin, Hyun-Suk · Min, Byung-Hwa · Kil, Gyung-Suk & Choi, CChool-Young(2010). Profiles of glucocorticoid receptor mRNA expression and physiological changes in response to osmotic and thermal stress conditions in Black Progy (*Acanthopagrus schlegeli*), Korean Journal of Ichthyology 15, 224~231.

- Barton, Bruce-A & Iwama, George-K(1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids, Annual Review of Fish Diseases 1, 3~26.
- Barton, Bruce-A · Peter, Richard-E & Paulence, Christine-R(1980). Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest, and subjected to handling, confinement, transport and stocking, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 37, 805~811.
- Chance, Britton · Sies, Helmut & Boveris, Alberto(1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, Physiological Reviews 59, 527~605.
- Chang, Young-Jin · Hur, Jun-Wook & Chin, Pyung(2002). Hematological characteristics of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in culture farm influenced by heated effluent water from Power Plant in summer, Journal of Aquaculture 15(4), 267~273.
- Chang, Young-Jin · Park, Myong-Ryong · Kang, Duk-Young & Lee, Bok-Kyu(1999). Physiological responses of cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) on series of lowering seawater temperature sharply and continuously, Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 32(5), 601~606.
- Chen, Jiann-Chu & Chen, Wei-Chi(2000). Salinity tolerance of *Haliotis diversicolor* supertexta at different salinity and temperature levels, Aquaculture 181, 191~203.
- Cho, Kyu-Seok · Min, Eun-Young & Kang, Ju-Chan(2002). Changes of hematological constituents in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to HCB and PCBs, Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 35, 110~114.
- Choi, Jin-Hyuk & Kim, Hyoung-Rae(1990). The effects of tryptophan and tyrosine-enriched diet on the serum cortisol, glucose and free fatty acid levels of stressed rats, Korean Journal of Nutrition 23(4), 229~236.
- Davis, Kenneth-B & Parker, Nick-C(1990). Physiological stress in striped bass: effect of acclimation temperature, Aquaculture 91, 349~358.
- Ferraris, Michela · Radice, Sonia · Catalani, Paolo · Francolini, Maura · Marabini, Laura & Chiesara, Enzo(2002). Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes: a time course study, Aquatic Toxicology 59, 283~296.
- Han, Hyoung-Kyun · Kang, Duk-Young · Jun, Chang-Young & Chang, Young-Jin(2003). Effect of salinity change on physiological response and growth of yearling sea bass, *Lateolabrax japonicus*, Journal of Aquaculture 16(1), 31~36.
- Hur, Jun-Wook(2002). Physiological responses of fishes to the artificial stresses in the process of aquaculture. A paper of doctor's degree, Pukyong National University. p196.
- Hur, Jun-Wook · Chang, Young-Jin · Lee, Bok-Kyu & Lee, Jeong-Yeol(2003). Effects of hypo-salinity on physiological response, survival and growth of cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), Korean Journal of Ichthyology 15(2), 77~84.
- Ishioka, Hiroko(1980). Stress reactions in the marine fish-I Stress reactions induced by temperature change, Nippon Suisan Gakkalshi 46, 523~531.
- Kang, Duk-Young · Kang, Hee-Woong · Kim, Gyu-Hee · Jo, Ki-Che & Kim, Hyo-Chan(2007). Effect of cold shock on the physiological responses of the cultured mullet, *Mugil heamatocheilus* in winter, Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 40(4), 226~233.
- Kim, Jong-Kyu & Kim, Jong-Hwa(2001). Diffusion modeling of cold discharge on coastal waters, The Korea Society for Fisheries and Marine Science Education 13, 132~145.
- Kim, Kyong-Min · Lee, Jung-Uie · Moon, Tae-Seok · Lee, Chang-Hoon · Yang, Moon-Hoo · Kang, Yong-Jin & Jo, Jae-Yoon(2008). Optimum feeding rate of parrot fish *Oplegnathus fasciatus* during the low temperature season. Journal of Aquaculture 21(4), 299~303.
- Kim, Tae-Hyung · Kim, Kyung-Ju · Choe, Mi-Kyung & Yeo, In-Kyu(2006). Physiological changes of juvenile abalone, *Haliotis sieboldii* exposed to acute water-temperature stress, Journal of Aquaculture 19(2), 77~83.
- Kim, Tae-Hyung · Yang, Moon-Hyu · Choe, Mi-Kyung · Han, Seok-Jung & Yeo, In-Kyu(2005). Physiological studies on acute water-temperature stress of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai*,

- Journal of Aquaculture 18(1), 7~12.
- Kim, Wan-Soo · Yoon, Seong-Jin · Moon, Hyung-Tae & Lee, Tae-Won.(2002). Effects of water temperature changes on the endogenous and exogenous rhythms of oxygen consumption in glass eels *Anguilla japonica*, Marine Ecology Progress Series 243, 209~216.
- Lee, Chu · Lee, Chae-Sung · Kim, Su-Kyoung · Kim, Wan-Ki & Jo, kyu-tae(2009). Analysis of population distribution on stocking area of sandy beach clam, *Gomphina melanaegis*, Journal of the Environmental Sciences 18(10), 1163~1170.
- Marklund, Stefan. & Marklund, Gudrun(1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, European Journal of Biochemistry 47, 469~474.
- Parihar, Mordhwah-S · Dubery, A-K · Javeri, Tarangni & Prakash, Prem(1996). Changes in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipid content in liver of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to elevated temperature, Journal of Thermal Biology 21(5/6), 323~330.
- Saucedo, Pedro-E · Ocampo, Lucia · Monteforte, Mario & Bervera, Horacio(2004). Effect of temperature on oxygen consumption and ammonia excretion in Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1866), Aquaculture 229, 377~387.
- Perry, Steve-F & Reid, Scott-D(1993).  $\beta$ -adrenergic signal transduction in fish: interactive effects of catecholamines and cortisol, Fish Physiology and Biochemistry 11, 195~203.
- Pickering, Alan-D · Pottinger, Tom-G & Carragher, John-F(1989). Differences in the sensitivity of brown trout, *Salmo trutta*, and rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to physiological doses of cortisol, Journal of Fish Biology 34, 757~768.
- Shim, Jae-Hyung · Yeo, Hwan-Goo & Shin, Yoon-Keun(1991). Ecological effects of thermal effluent in the Korean Coastal Water I. Significance of autotrophic nano and picoplankton in the adjacent waters of Kori Nuclear Power Plant, The Journal of the Oceanological Society of Korea 26(1), 77~82.
- Steinarsson, Agnar & Imsland, Albert K(2003). Size dependent variation in optimum growth temperature of red abalone (*Haliotis rufescens*), Aquaculture 224, 353~362.
- Yang, Joung-Hwan & Yeo, In-Kyu(2001). Physiological studies on acute water-temperature stress of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), Korean Journal of Ichthyology 16(1), 19~26.
- 
- Received : 14 September, 2015
  - Revised : 11 November, 2015
  - Accepted : 16 November, 2015